

Determination of Volatile Metabolite Markers Using HS-SPME-GC-MS Technique Illékony Anyagcseremarkerek Meghatározása HS-SPME-GC-MS Technikával

Loretta Juhász¹, Dalma Radványi^{1*}, Zsuzsa Jókai¹, Péter Fodor¹

¹Department of Applied Chemistry, Corvinus University of Budapest, H-1118 Budapest,
Villányi út 29-43., Hungary

e-mail: dalma.radvanyi@uni-corvinus.hu (radvanyi.dalma@gmail.com)

Abstract

In our study, headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) technique was used to analyse microbial volatile organic compounds (MVOC's) of a mushroom disease-related microorganism: *Trichoderma aggressivum*. Its volatile metabolite markers were monitored and then identified. To make reliable identification results, different manual correction steps were implemented into the evaluation process (depending on the compound intensity or on the rate of compound coelution). Identification steps were the follows: background subtraction then manual deconvolution. In some cases, compounds' molecular ion appeared on the mass spectra, which molecular ion's m/z value was also used for the identification. Moreover retention index (RI) of the evaluated compound was also calculated then compared to the RI values found in the literature and WebBooks.

Bevezetés

A gázkromatográfia széles körben alkalmazott módszer a komplex illékony és fél-illékony minták elemzésére. Az élelmiszerminták gázkromatográfiás méréséhez történő előkészítés általában hosszú és munkagényes folyamat, magába foglalva a homogenizálást, többszöri extrakciót, centrifugálást és egyéb előkészítési műveleteket. Az elmúlt 15-20 évben ezért megnövekedett az igény a gyorsabb GC-s módszerekre. Ezen igények és az egyre inkább elterjedő oldószermentes vizsgálatokra való törekvés hívta életre a HS-SPME-GC-MS (Gőztér analízis szilárd fázisú mikroextrakció gázkromatográfia és tömegspektrométeres analízátor kapcsolt rendszer) kapcsolt rendszer működtetését.

A gőztér analízishez használt SPME eszköz kifejlesztése Arthur és Pawliszyn nevéhez fűződik [1]. A mintavételhez egy kvarcüveg szál külsejét vonják be a megfelelő állófázissal (szorbens réteggel). A vizsgálandó komponens extrahálása és koncentrációja közvetlenül erre a szálbevonatra történik. Ezt követően a GC injektorában megtörténik a deszorpció, és az extrahált komponensek elválasztásra kerülnek. A technika nagy előnye, hogy oldószermentes, alkalmazásával idő és költség takarítható meg azáltal, hogy direkt mintavétellel mérhetőek az illékony komponensek a gőztérből [2, 3].

Kezdetben a SPME mintavételi módszert illékony szerves vegyületek (VOCs) meghatározására használták környezeti mintákból. Ma már a technikát a biogógyászat területén, az élelmiszerelemzésben, továbbá kevésbé illékony vegyületek meghatározására is alkalmazzák [3]. Számos kutatás irányult már különböző mikrobiális illékony vegyületek (MVOCs) vizsgálatára is [5,6]. Kluger és társai [7] szintén vizsgáltak fonalas gombafajok által termelt MVOC vegyületeket HS-SPME-GC-MS technikával. A kiértékelés és vegyület azonosítás során a komponens LTPRI (lineáris hőmérsékletprogram mellett számolt retenciós index) értékeit és a tömegspektrum vizsgálatát vették alapul. Az LTPRI meghatározásához alkán homológ sort használtak, majd ennek segítségével számolták ki az egyes

komponensekhez tartozó retenciós index értékeket, melyeket később az irodalomban lévő értékekkel vetettek össze. A komponensek tömegspektrumának vizsgálatához AMDIS kiértékelő programot használtak, mely segítségével elvégezték a dekonvolúciót, így egy zavaró fragmesektől mentes tömegspektrumhoz jutottak, majd az adott komponenszt azonosították.

Célkitűzés

A gombatermesztésben a csiperke és más termesztett gombafajok zöldpenészes megbetegedésért felelős *Trichoderma aggressivum* kórokozó illékony anyagcseretermékeinek (MVOCs) vizsgálatát tűztük ki célul. A mikroorganizmus minél közelebbi megismerése érdekében célunk volt a gomba illékony anyagcseretermékeinek feltérképezése HS-SPME-GC-MS technikával, valamint adatbank segítségével a megjelenő komponensek azonosítása, ezáltal a kórokozó jelenlétének indikálása.

Anyagok és módszerek

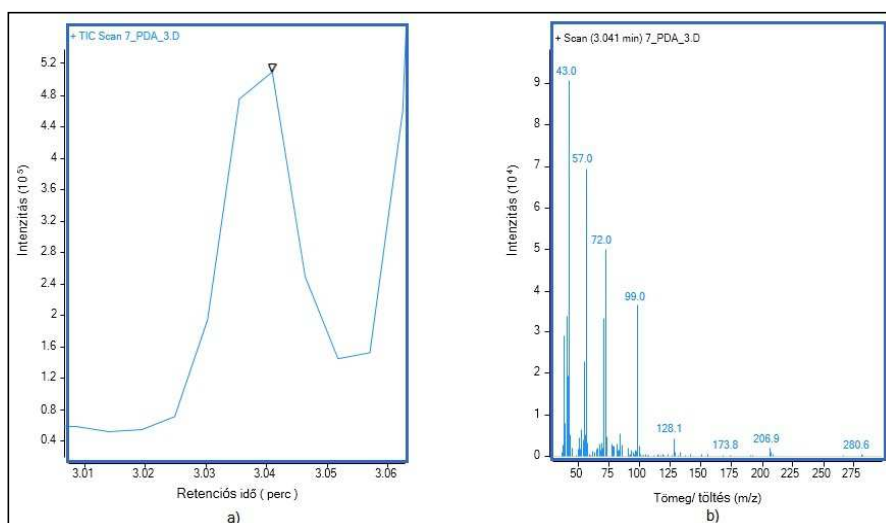
Trichoderma aggressivum spóra szuszpenzióból készítettünk leoltást PDA táptalajokra ($2,4 \cdot 10^8$ spóra/ 500 μ L) 20 ml-es üvegcsébe, melyeket a leoltást követően légmentesen lezártunk. Ezután 24 °C-on 7 napon keresztül növekedett a penész, melyet naponta monitoroztunk. A méréseket három párhuzamosban és kontroll minta vizsgálatával végeztük.

Az extrakció 65 μ m Stable Flex™ PDMS/DVB bevonatú szállal történt napi egyszeri 15 perces mintavétellel majd 4 percig tartó deszorpcióval (250 °C). Agilent 6890 típusú gázkromatográf és 5975 C MSD típusú tömegspektrométer kapcsolt analitikai rendszert használtunk optimált paraméterek között [8]. Agilent Enhanced MSD ChemStation szoftvert alkalmaztunk a GC-MS paramétereinek felügyeléséhez. A kromatogramok teljeskörű kiértékelése (dekonvolúció, háttérkorrekció, integrálás...) Agilent Enhanced Data Analysis és Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 szoftverek segítségével, míg az egyes komponensek azonosítása NIST (NIST 2011, Wiley 10th edition) könyvtár segítségével történt tömegspektrumuk alapján.

Eredmények

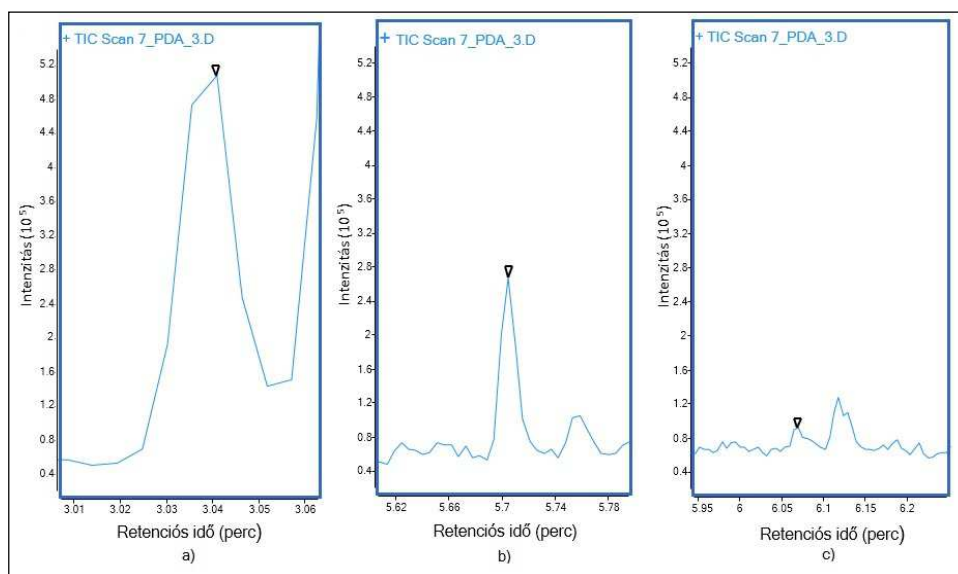
1) Egyértelmű azonosítás

Az azonosítás során talált kellően nagy intenzitású csúcsok ($4 \cdot 10^5$ intenzitás értéknél nagyobb) esetében a csúcs a háttértől kellőképp elvált, az alig zavart. Az adatbank (NIST) segítségével nagy találati eredménnyel jól azonosíthatóak ezek a komponensek. Ilyen egyértelmű vegyületként azonosítottuk az oktanont, 3,04 perc retenciós időnél és 93,46%-os találati átlaggal. (1.ábra a)



1. ábra: Azonosított oktanon csúcs (a) és tömegspektruma (b)

Az ilyen karakterisztikus csúcsok akár automatikus kiértékelő szoftverek segítségével is azonosíthatók (például: MassHunter Unknown Analysis, MassHunter Quantitative Analysis, Metbolite Detector), köszönhetően az intenzív tömegspektrumnak (1. ábra b). Méréseink során azonban a komponensek nagy része közepes ($1,2 \cdot 10^5$ és $3 \cdot 10^5$ közé eső intenzitás érték), illetve kis (közel alapvonalban lévő) intenzitású volt, ami igen nehezítette az azonosítást (2. ábra a) b) c)).



2. ábra: Nagy (a), közepes (b) és kis (c) intenzitású komponensek

2) Eredményes azonosítás egyszeri háttérkorrekcióval

Kisebbségi intenzitású csúcsok (2. ábra b) esetében az azonosítást a háttér kivonás segítségével végeztük. Ez esetben a háttér (zaj) spektruma kivonható az adott komponens tömegspektrumából, így egy háttérzajtól mentes, tiszta komponens tömegspektrumot kapunk. E módszerrel történő azonosítás során a 70 % fölötti találatlallal megjelenő vegyületeket elfogadtuk.

3) Kis intenzitású csúcsok több lépéses azonosítása

Az alapzajtól alig elkülöníthető, kis intenzitású, de egyértelműen komponens jelenlétét jelző csúcsok azonosítását több oldalról kellett megközelítenünk. Vizsgáltuk önmagában a komponens tömegspektrumát (itt háttérzavarás előfordulhat), illetve ugyanezen komponens háttérmentes tömegspektrumát is. A kis intenzitású komponensek esetében azonban sokszor hibát követhetünk el az alapzaj (háttér) kivonásával. A hibát az okozhatja, hogy a kiértékelő szoftver a kis intenzitás miatt a komponensből származó fragmens ion m/z értékét is háttérként azonosíthatja és kivonja, melyekkel fals eredményekhez juthatunk.

Fontos tehát megnéznünk az eredeti, illetve a háttérmentes tömegspektrumot és a kettőt összevetni. Kisebb mértékű átfedésben érkező, koeluálódó komponensek esetén is hasonló, többlépéses visszaellenőrzéses, manuális eljárást végeztünk.

A kisebb találati százalékkal azonosítani vélt komponens esetében segíthet a molekula tömegének figyelembevétele. Az ionizációt követően ugyanis van esély arra, hogy a molekulából történő egy elektronvesztéssel keletkező molekulaion is megjelenik, melynek tömege (az elektron elhanyagolható tömege miatt) megegyezik a molekuláéval. Ami még segítségünkre lehet, az az adott komponens NIST könyvtárban vagy Webbook-ban található retenciós indexe (RI). A könyvtárban fellelhető és az általunk számolt retenciós index összevethető, ami információval szolgálhat az azonosításra vonatkozóan. Végül támpontként szolgálhat a szakirodalom ismerete is, ott esetleg találunk utalást arra nézve, hogy az általunk azonosítottként vélt komponens valóban jellemző-e az adott penészgombára.

Összefoglalás

Összességében elmondható, hogy a HS-SPME-GC-MS kapcsolt technika alkalmas mikrobiológiai illékony vegyületek meghatározására. A vizsgálatok során *Trichoderma aggressivum* faj illékony anyagcseretermékeit monitoroztuk hét napon keresztül és azonosítottuk a megjelenő csúcsokat. Az azonosítás az egyértelmű és nagy intenzitást adó vegyületek esetében nem jelentett gondot, adatbázis alkalmazásával könnyedén végrehajtottuk a feladatot.

A kisebb, alacsony intenzitású komponensek azonosítását több oldalról közelítettük meg: a háttér kivonásával illetve a háttér kivonása nélkül. Az eredmény biztosítása érdekében RI indexeket mértünk, melyeket irodalmi adatokkal hasonlítottunk össze.

Összességében elmondható, hogy az automatikus kiértékelő szoftver kizárólagos használata a kis intenzitású komponensek esetében nem vezet eredményre. A háttér kivonásával, esetleg retenciós indexek figyelembevételével, manuális értékeléssel azonban helytálló eredmény születhet.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők szeretnék megköszönni a segítséget Geösel Andrásnak, aki a penész leoltásában és előkészítésében segített.

Irodalomjegyzék

- [1] Arthur, C.L., Pawliszyn, J. 1990. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica OpticalFibers. *Analytical Chemistry*. 62:2145-2148.
- [2] Koning, S.D., Janssen, H.G., Brinkman, U.A.Th. 2009. Modern Methods of Sample Preparation for GC Analysis. *Chromatographia*. 69(1):33-78.

- [3] Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J. 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 880:35–62.
- [5] Malheiro, R., Pinho, P.G., Soares, S. et. al. 2013. Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination. *Food Research International*. 54:186–194.
- [6] Pinho, P.G., Ribeiro, B., Gonçalves R.F. et. al. 2008. Correlation between the Pattern Volatiles and the Overall Aroma of Wild Edible Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(5):1704–1712.
- [7] Kluger, B., Zeilinger, S., Wiesenberger, G., Schöffbeck, D., Schuhmacher, R. 2013. Detection and identification of fungal microbial volatile organic compounds by HS-SPME-GC-MS. In Gupta, V.K., Tuohy, M., Ayyachamy, M., Turner, K.M., O. Donovan A. (Eds): *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*, Springer ISBN: 978-1-4614-2355-3, pp. 455-466.
- [8] Radványi D, Gere A, Jókai Zs, Fodor P (2015) Rapid evaluation technique to differentiate mushroom disease-related moulds by detecting microbial volatile organic compounds using HS-SPME-GC-MS., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:537–545, DOI 10.1007/s00216-014-8302-x